

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 62091182
PUBLICATION DATE : 25-04-87

APPLICATION DATE : 18-10-85
APPLICATION NUMBER : 60234163

APPLICANT : KOBAYASHI SEIYAKU KK;

INVENTOR : UEDE SHIGEMI; FUJIMURA KATSUYUKI; ASANO KENJI;

INT.CL. : C12N 9/78 // (C12N 9/78 , C12R 1:05)

TITLE : PRODUCTION OF CREATINE AMIDINOHYDROLASE

ABSTRACT : PURPOSE: To obtain the titled substance in high efficiency in one step, by culturing a microbial strain belonging to Alcaligenes genus and having extracellular productivity of creatine amidinohydrolase.

CONSTITUTION: A microbial strain belonging to Alcaligenes genus, etc., (e.g. FERM P-5071) and having extracellular productivity of creatine amidinohydrolase is cultured in a conventional medium containing nitrogen source, carbon source, inorganic salt, etc. The accumulation efficiency of creatine amidinohydrolase can be increased by adding creatine to the medium. After the completion of the culture, the solid component such as microbial cell is removed from the medium e.g. by filtration, centrifugal separation, etc. The objective creatine amidinohydrolase can be separated from the culture liquid by conventional separation and purification means.

COPYRIGHT: (C) JPO

⑪ 公開特許公報 (A)

昭62-91182

⑫ Int.Cl.⁴C 12 N 9/78
//(C 12 N 9/78
C 12 R 1:05)

識別記号

府内整理番号

7421-4B

⑬ 公開 昭和62年(1987)4月25日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 クレアチン・アミジノヒドロラーゼの製造法

⑮ 特願 昭60-234163

⑯ 出願 昭60(1985)10月18日

⑰ 発明者 植出成美 高槻市天王町21-9

⑰ 発明者 藤村勝行 伊丹市柏木町2丁目16

⑰ 発明者 浅野健治 宝塚市逆瀬台2-7番30-603

⑰ 出願人 小林製薬株式会社 大阪市東区道修町5丁目25番地

⑰ 代理人 弁理士 辻本一義

明細書

1. 発明の名称

クレアチン・アミジノヒドロラーゼの
製造法

2. 特許請求の範囲

1. アルカリゲネス属に属し、菌体外クレアチン・アミジノヒドロラーゼ生産能を有する菌株を培養し、培養液よりクレアチン・アミジノヒドロラーゼを分離、回収することを特徴とするクレアチン・アミジノヒドロラーゼの製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

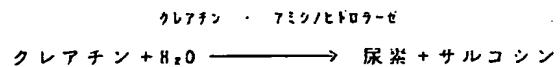
この発明は、アルカリゲネス属に属し、菌体外クレアチン・アミジノヒドロラーゼ生産能を有する菌株を培養してクレアチン・アミジノヒドロラーゼを製造する方法に関するものである。

(従来の技術)

血清クレアチン濃度は原発性筋疾患、筋炎、筋萎縮、甲状腺機能亢進症などで増加し、クレアチ

ン尿をきたす。従って、クレアチンの定量を行なうことは、臨床医学診断上極めて重要である。そこで、クレアチン・アミジノヒドロラーゼが、クレアチンを特異的に分解する性質を用いクレアチンの酵素定量法に利用している。

クレアチン・アミジノヒドロラーゼ (EC 3.5.3.3) は公知の酵素であり、この酵素はクレアチンに作用して尿素とサルコシン (Sarcosine) に加水分解する酵素であり、その反応式は次の通りである。



従来、クレアチン・アミジノヒドロラーゼは特開昭47-43281号公報及び特開昭55-34029号公報に示唆されているようにアルカリゲネス属に属する細菌に存在することが知られている。

(発明が解決しようとする問題点)

しかし、これらのアルカリゲネス属より得られるクレアチン・アミジノヒドロラーゼはいずれも菌体内酵素であるため、この酵素を得るために

培養固体を集団して、これを磨碎、超音波処理または溶菌処理して、酵素を分離、抽出する操作を必要とするため、酵素精製操作が著しく複雑化し、効率よく酵素を得ることができないという問題点があった。

(問題点を解決するための手段)

そこで、この発明は培養固体より抽出操作過程を経ずとも、一段操作で効率よく、クレアチン・アミジノヒドロラーゼを得ることを目的として以下のような手段を講じた。

すなわちこの発明は、アルカリゲネス属に属し、固体外クレアチン・アミジノヒドロラーゼ生産能を有する菌株を培養し、培養液よりクレアチン・アミジノヒドロラーゼを分離、回収するものである。

この発明に使用される菌株としては、アルカリゲネス属に属し、固体外クレアチン・アミジノヒドロラーゼ生産能を有する菌株であれば、いかなる菌株でもよい。

そして、アルカリゲネス属に属する具体例とし

ては、アルカリゲネス属菌株（微研菌奇第5071号）等が挙げられる。

以下、アルカリゲネス属菌株（微研菌奇第5071号）の菌学的性質について述べる。

a) 形態 幅 0.5~1.0 μ、長さ 1.5~3.5 μ で单桿菌または2連菌のように観察される。

運動性：1本の鞭毛を有し、運動性あり。

グラム染色性：陰性。

抗酸性：陰性。

夾膜：なし。

b) 各培地における生育状態

① 肉汁寒天平板培養

28℃、48時間の培養で直徑 3~5 mm の隆起した円形コロニー、表面はなめらかでつやのある同様円形状の集落を形成する。

② 肉汁寒天斜面培養

28℃、48時間の培養で拡幅状に生育する。コロニーの色は半透明の乳白色で、表面はつやがあり、拡散性色素を生成しない。

③ 肉汁液体培養

静置培養では殆ど生育が認められない。

④ 肉汁寒天穿刺培養

28℃、48時間の培養で表面及び穿刺穴に生育する。

⑤ 肉汁ゼラチン穿刺培養

20℃、1~14日間の培養で表面ないし上部に生育するが、液化は認められない。

⑥ リトマスマルク

培養とともにゆっくりアルカリ性となり、リトマスをわずかに還元するが、液化、凝固はしない。

⑦ バレイショ寒天培地

28℃、24時間の培養で拡幅状によく生育する。コロニーの色は半透明の乳白色あるいは灰白色で表面はなめらかでつやがある。

c) 生理学的性質

① 硝酸塩の還元：なし。

② 脱窒反応（駒形らの方法）：陰性。

③ M R テスト：陰性。

④ V P テスト：陰性。

⑤ インドールの生成：生成せず。

⑥ 硫化水素の生成：生成せず。

⑦ デンプンの加水分解：分解せず。

⑧ クエン酸の利用：利用する。

(Koser Citrate 培地及び Christensen 培地)

⑨ 無機窒素源の利用（飯塚・駒形の方法）

硝酸塩：利用する。

アンモニウム塩：利用する。

⑩ 色素の生成：ビオシアニン系色素を生成せず。

⑪ ウレアーゼ：生成する。

⑫ オキシダーゼ：生成する。

⑬ カタラーゼ：生成する。

⑭ 生育の範囲：pH 6.5 ~ 9.5、至適 pH 8.0 附近、
温度 20~30℃、至適温度 28℃、
(培地は肉汁寒天培地使用)。

⑮ 酸素に対する態度：好気性。

⑯ O-F テスト (Hugh-Leifson 試験)：酸化的にも酵酇的にも糖を分解しない。

⑰ 糖からの酸及びガスの発生：L-アラビノ-

ス、D-キシロース、D-グルコース、D-マンノース、D-フラクトース、D-ガラクトース、麦芽糖、ショ糖、乳糖、トレハロース、D-ソルビット、D-マンニット、イノシット、グリセリン、デンプンのいずれの糖からも酸及びガスの発生は認められない。

d) その他の性質

- ①ガゼインのペプトン化：生成せず。
- ②タマゴの消化：消化せず。
- ③アルギニンの加水分解：分解せず。
- ④フェニルビルピン酸テスト：陰性。
- ⑤インドフェニル酸テスト：陰性。
- ⑥アセトイソイ生産：生産せず。
- ⑦グルクロン酸の酸化：酸化せず。
- ⑧リジンの脱炭酸の反応：陰性（シモンズ・エン酸培地及びL-T-M培地）。
- ⑨ β -ガラクトシダーゼ：生成する。

⑩炭素化合物の利用：L-アラビノース、D-キシロース、D-グルコース、D-マンノース、D-フラクトース、D-ガラクトース、麦芽糖、ショ糖、乳糖、トレハロース、ラフィノース、D-ソルビット、イノシット、グリセリン、サリシン、 α -メチルグルコシッド、イスリン、デキストリン、デンプン、セルロース、L-ソルボース、セロビオース、グリコゲン、エリスリオール、ビルピン酸、乳酸、マロン酸、シュウ酸、d-酒石酸、醋酸及びプロピオン酸を利用しない。ラムノース、コハク酸、クエン酸、酢酸及びフェニルアラニンをそれぞれ資性化できる。

この発明に用いられた菌株の諸性質をBergey's Manual of Systematic Bacteriology 第1巻 (19

83年) の分類と対比すると本菌株は、グラム陰性、好気性の桿菌で1本の鞭毛を有し、運動性があること、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性、糖から酸及びガスの生成が認められることより、アルカリゲネス属に属すると判定される。

上述の菌株を用いて、以下クレアチン・アミジノヒドロラーゼの製造方法について述べる。

この発明に用いられるアルカリゲネス属菌株は、固型培地を用いて培養することができるが、液体培地を用い、振盪培養または通気攪拌深部培養を行なうのが望ましい。

培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用される。窒素源としては、利用可能な窒素源であればよく、大豆粉、コンスティーブリカ、種々の肉エキス、ペプトン、酵母エキスなどが使用される。炭素源としては、利用可能な炭素化合物であればよく、糖類、可溶性でんぶん、グリセリンなどが使用される。その他無機塩として、硝酸ナトリウム、塩化ナトリウム、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、塩

化カリウム、硫酸第一鉄、硫酸銅、塩化マンガン、硫酸亜鉛などが必要に応じて使用される。また培地中にクレアチンを添加すれば、培養液中のクレアチン・アミジノヒドロラーゼの蓄積が増加する。その添加濃度は0.5~1.0%程度が好ましい。

培養温度は菌が発育し、固体外にクレアチン・アミジノヒドロラーゼを生産する温度範囲内ならばいかなる温度でもよく、好ましくは約28℃である。培養時間は条件によって多少異なるが、通常2~5日間である。そして、培養液中のクレアチン・アミジノヒドロラーゼ生産量が、最高に達する時期を見計らって適当な時期に培養を終了すればよい。

培養液よりクレアチン・アミジノヒドロラーゼを分離するには、まず浮遊、遠心分離等により、固体その他の固形分を除去し、得られた粗製クレアチン・アミジノヒドロラーゼ含有液をさらに公知の蛋白質、酵素などの単離、精製手段を用いることにより、精製されたクレアチン・アミジノヒ

ドロラーゼを得ることができる。たとえば、粗製のクレアチン・アミジノヒドロラーゼに、必要に応じて硫酸ストレプトマイシン水溶液、硫酸プロタミン水溶液を加えて核酸などを除去し、これに硫酸アンモニウムなどを加えて塩析させるか、アセトン・エタノールなどの有機溶媒を加えて、分別沈殿させ、沈殿物を集め。さらにこの沈殿物を精製するには、たとえば沈殿物をトリスー塩酸緩衝液などの溶媒に溶解し、ジエチルアミノエチルーセルロースイオン交換体、ジエチルアミノエチルーデキストラニオン交換体、ジエチルアミノエチルーアガロースイオン交換体などの陰イオン交換体を用いる吸着溶出法、デキストラングル、ポリアクリルアミドゲルなどのゲル汎過剤によるクロマトグラフ法、ハイドロキシアバタイトによる吸着溶出法及びポリアクリルアミドゲル等を用いる電気泳動法を行なえばよい。

これらの手段は、適宜選択、組合させて行ない、次いで真空凍結乾燥などの手段により、乾燥して精製されたクレアチン・アミジノヒドロラーゼ

粉末を得る。

次に、この発明で得られたクレアチン・アミジノヒドロラーゼの理化学的性質について述べる。

①作用

この酵素はクレアチンを加水分解して、尿素とサルコシンにする作用を有し、クレアチンに対する K_m （ミカエリス（Michaelis）定数）値は、 $4.83 \times 10^{-3} M$ (37°C pH7.8) である。

②力価測定法

クレアチン 0.1M を含有した 50mM リン酸緩衝液 (pH7.8) 1.0 mL、適当に希釈した酵素液 0.1 mL 加え、37°C で 10 分間反応させたのち、これに P-ジメチルアミノベンズアルデビド溶液 (2.0g の P-ジメチルアミノベンズアルデビドを 100 mL ジメチルスルホキシドに溶解させたのち、濃塩酸 15 mL 加えたもの) 2.0 mL 添加し、25°C で 20 分間放置する。酵素反応 0 分の時の試料を対照として分光光度計により 435nm にて吸光度 (△OD) を測定し、次の通り計算する。

$$\text{酵素液 } 1 \text{ mL 中の酵素活性単位 (U / mL)} = \Delta OD \times 9.66 \times \text{酵素希釈倍率}$$

ここで、クレアチン・アミジノヒドロラーゼ酵素活性は上記の反応条件下で 1 分間に 1 μmol 尿素を生成する酵素量を 1 単位 (1 U) とする。

③至適pH

至適pHは7.0～8.0付近である。

使用した緩衝液は pH6.0～8.0: リン酸緩衝液、pH7.0～9.0: トリスー塩酸緩衝液、pH8.5～9.5: 炭酸緩衝液である。

④pH安定性

各pHの緩衝液に酵素を加え、5°Cにて48時間放置したのち、その残存活性を測定した。使用した緩衝液は前記のものと同様である。その結果、クレアチン・アミジノヒドロラーゼは pH7.0～8.5 付近で安定であると認められる。

⑤熱安定性

クレアチン・アミジノヒドロラーゼの 50mM

リン酸緩衝液溶液 (pH7.5) 1.0 mL を各温度にて 30 分間処理したのち、酵素の残存活性を測定した。その結果、クレアチン・アミジノヒドロラーゼは 40°C 付近以下で安定であると認められる。

⑥至適温度

クレアチン・アミジノヒドロラーゼの反応

の至適温度は 40°C 付近であると認められる。

⑦分子量

約 50,000 (ゲル汎過法により測定)

〔作用〕

この発明で用いる菌は、菌体外酵素生産能を有するので、酵素は培養液中に蓄積する。

したがって、菌体内酵素生産菌の場合のように、培養液より菌体を分離し、これを砕碎、超音波処理または自己消化等により酵素を分離、抽出する必要がない。

〔実施例〕

以下、この発明を実施例に基づきさらに具体的に説明する。

実施例1

可溶性でんぶん1.0% (w/v)、グルコース1.0% (w/v)、肉エキス0.75% (w/v)、ポリペプトン0.75% (w/v)、MgSO₄·7H₂O 0.1% (w/v)、微量金属溶液(CuSO₄·5H₂O 10.0g、MnCl₂·4H₂O 10.0g、ZnSO₄·7H₂O 100.0gを900mLの蒸留水に溶かし、液が透明になるまで塩酸を加え、蒸留水で1Lとする)0.1% (w/v)よりなる培地110mL (pH7.4)を、500mL容の坂口フラスコに加え、120℃で20分高压滅菌後、アルカリゲネス菌株(微研菌奇第5071号)を接種し、28℃で2日間振盪培養して種菌を得た。次いでこの種菌をグルコース2.0% (w/v)、大豆粉2.0% (w/v)、ポリペプトン0.2% (w/v)、クレアチン0.5% (w/v)、NaNO₃ 0.2% (w/v)、KH₂PO₄ 0.1% (w/v)、MgSO₄·7H₂O 0.05% (w/v)、KCl 0.05% (w/v)、FeSO₄·7H₂O 0.0001% (w/v)よりなる培地(pH8.0)5Lの入った滅菌後の10L容のジャーファメンターに移植し

、28℃で2日間、回転数400rpm、通気量0.8L/m³の条件下通気攪拌培養した。

次に得られた培養液を回転数3,500rpmで20分間冷却遠心し、固体その他の固形分を除き、粗製のクレアチン・アミジノヒドロラーゼ含有液4050mLを得た。(クレアチン・アミジノヒドロラーゼ純活性3888U)

この粗製酵素液に硫酸アンモニウム2090gを添加して沈殿物を回収した。この沈殿物を20mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.8)500mLに溶解して、同一緩衝液に対して一晩透析後、この溶液20mLを20mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.8)で平衡化したDEAE-セルロース(ワットマン社製)を充填したカラム(径3cm×21cm)にチャージし、0.15M NaCl含有の同一緩衝液にて洗浄後、NaCl 0.15M~0.7Mの濃度勾配で溶出し、活性画分を回収し、次にこの活性画分を限外済過器(東洋科学産業社製)を用いて濃縮した後、20mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.8)に対して1晩透析した後、この溶液を凍結乾燥してクレアチン・アミジノヒドロラーゼの粉末

(全活性1230U、蛋白質量350mg、比活性3.5U/mg回収率32.2%)を得た。

(発明の効果)

以上に述べた如く、この発明によれば培養固体より抽出操作過程を経ずとも、一段操作で効率よく、クレアチン・アミジノヒドロラーゼを得ることができる。

代理人 弁理士 辻 本 一 義